

**REMARKS**

Claims 1, 3-8, 1-16, 19-20, 36-37 and 52-63 are pending. Claims 1 and 52 have been amended to recite a fermentation medium consisting essentially of chemically defined constituents, wherein the amount of complex carbon and/or nitrogen source is at most about 10 % of the total amount of carbon and/or nitrogen. The amendments are supported in the specification at least on page 5, lines 3-14 and page 6, lines 6-16. The specification has also been amended to correct typographical errors. Thus, no new matter is added.

The Office has maintained all rejections previously made. Applicants address each rejection in view of the amended claims. Applicants also respectfully request reconsideration and allowance of the pending claims, as amended, in light of the remarks presented herein.

**Rejections under 35 U.S.C. § 112**

Claims 1, 3-8, 15-16, 19-20, 36-37 and 52-63 remain rejected under 35 U.S.C. § 112, second paragraph, as allegedly being indefinite. In particular, the Office suggested clarification on what the fermentation medium encompasses. To expedite prosecution, Applicants have amended claims 1 and 52 to indicate that the fermentation medium consists essentially of chemically-defined substituents, wherein the amount of complex carbon and/or nitrogen source is at most about 10 % of the total amount of carbon and/or nitrogen.

The term “fermentation medium consisting essentially of chemically defined constituents” is clear and definite from the specification. In particular, the terms “chemically defined” constituents, and “complex” sources (*i.e.*, “complex raw materials” or “complex media”) in reference to culture medium are well-known to those skilled in the art. Thus, it is clear what the fermentation medium encompasses.

As indicated in the specification, complex media have a chemically undefined composition due to the fact that the ingredients contain many different compounds, and have a variable composition due to seasonal variation and differences in geographic origin. Typical

examples of complex raw materials functioning as complex carbon and nitrogen sources are corn steep liquor, yeast extract, soybean meal, cotton seed meal, and molasses. (Specification at 5:14-23). Other examples of complex media which are formulated using ingredients of natural origin are blood and meat extracts. (See e.g., "Traders' Guide to Fermentation Media Formulation, at page 2, copy attached at Exhibit 1 for the Examiner's convenience).

In contrast, chemically defined media are compounds having precisely defined proportions, and thus can be characterized chemically. For example, chemically defined carbon sources include but are not limited to simple sugars, starch, inulin, glycerol, vegetable oils, hydrocarbons, alcohols, organic acids, and the like. Chemically defined nitrogen sources include but are not limited to urea, ammonia, nitrate, ammonium salts, amino acids, and the like. (Specification at 8:18-9:6). Because Applicants have clearly defined what the fermentation medium encompasses, the claims are definite. Applicants therefore respectfully request that this rejection be withdrawn.

#### Rejections under 35 U.S.C. § 103

Claims 1, 3-8, 15-16, 19-20, 36-37 and 52-63 remain rejected under 35 U.S.C. § 103(a), as allegedly being unpatentable over Hogye *et al.* (Derwent 1987-357537), in view of Bovenberg *et al.* (U.S. patent 5,731,163 [sic]), and Microbiology, fourth edition (Pelezar *et al.*, pages 853-856). The Office rejected Applicants' arguments that there is no motivation to combine the references teaching a fermentation medium of complex raw material because "applicant has not clearly defined what his fermentation medium encompasses." (Office action, page 2). The Office also indicated that Microbiology, page 855, step 5, teaches a chemically defined medium for the production of penicillin. Applicants must respectfully disagree, and address the rejection in view of the amended claims.

As previously indicated, claims 1 and 52 have been amended to recite a fermentation medium consisting essentially of chemically defined constituents, wherein the amount of complex carbon and/or nitrogen source is at most about 10 % of the total amount of carbon and/or nitrogen.

Unlike the invention, none of the references alone or in combination, teaches a fermentation medium consisting essentially of chemically defined constituents. Thus, even if combined, the combination fails to teach all the elements of the claimed invention (*i.e.*, large scale  $\beta$ -lactam production using a fermentation medium consisting essentially of chemically defined constituents).

Hoyge *et al.* only suggest small scale production using complex media. As indicated in the Hoyge patent and in an English translation of the first two examples in the Hoyge patent (copy attached at Exhibits 2 and 3, respectively), the fermentation medium comprises primarily peanut flour and corn steep liquor (*i.e.*, first two constituents listed in each example), each of which is a complex medium and comprising over 50 % of the medium. Furthermore, the Hoyge patent teaches a small scale production of up to 1 m<sup>3</sup>. (See, Hoyge patent, examples). In contrast, claim 1 specifically recites a fermenting step on a volume scale of at least 10 m<sup>3</sup>.

Bovenberg *et al.* also teach a small scale production using complex raw materials. Example 1 for instance teaches the inoculation of adipoyl-7-ADCA producing transformants in a seed medium consisting of (g/L): glucose, 30; cotton seed meal, 10; corn steep solids 20; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20; CaCO<sub>3</sub>, 5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5; lactose, 10; and yeast extract, 10. Cotton seed meal, corn steep solids and yeast extract are complex medium, which comprises about 40 % of the seed medium. One mL of the seed culture was used to inoculate 15 mL of production medium (*i.e.*, a small scale production).

Furthermore, the Microbiology reference fails to teach a chemically defined medium. Contrary to the Examiner's assertions, the reference at page 855, step 5, referring to the "addition of chemicals to the medium which served as precursors for synthesis of penicillin" does not refer to a chemically defined medium. First, the composition of the chemicals added to the medium for the synthesis of penicillin is undefined. Second, Figure 40-4 at page 856 of the Microbiology reference teaches the industrial manufacture of penicillin using a medium of corn-steep liquor, lactose, salts, and other ingredients that are not chemically defined. Corn-steep liquor is a complex material of chemically undefined composition. (See e.g., specification at 5:19-23).

Because none of the references teach a fermentation medium consisting essentially of chemically defined constituents, the combination would only teach large scale  $\beta$ -lactam production using a fermentation medium composed of complex raw material such as corn steep liquor. Furthermore, there is no reasonable expectation of success that a fermentation medium consisting essentially of chemically defined constituents may be used for large scale  $\beta$ -lactam production. As indicated in the specification, the product yields which would be obtained using chemically defined media on an industrial scale were typically considered to be substantially lower than those obtained using media containing complex raw materials. In addition, high-producing microbial strains which have been developed for industrial processes in complex media were suspected not to retain their good performance in chemically defined media. (See, Specification at 2:34-3:7).

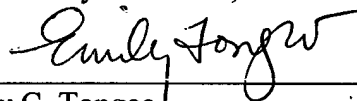
Based on the above, the claims are nonobvious. Thus, Applicants respectfully request that the rejections under 35 U.S.C. § 103 be withdrawn, and the claims be passed to allowance.

In view of the above, each of the presently pending claims in this application is believed to be in immediate condition for allowance. Accordingly, the Examiner is respectfully requested to withdraw the outstanding rejection of the claims and to pass this application to issue. If it is determined that a telephone conference would expedite the prosecution of this application, the Examiner is invited to telephone the undersigned at the number given below.

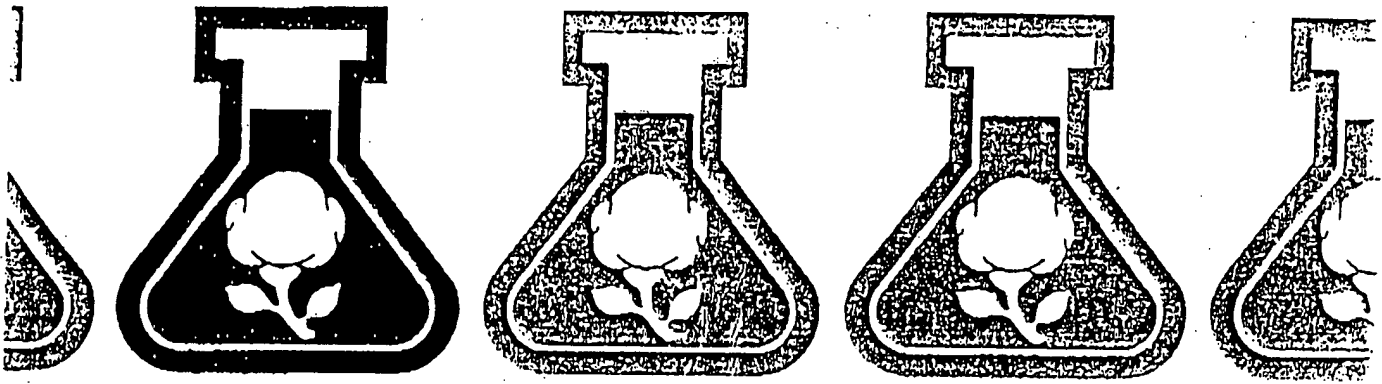
In the event the U.S. Patent and Trademark office determines that an extension and/or other relief is required, applicant petitions for any required relief including extensions of time and authorizes the Commissioner to charge the cost of such petitions and/or other fees due in connection with the filing of this document to Deposit Account No. 03-1952 referencing docket no. 246152012710. However, the Commissioner is not authorized to charge the cost of the issue fee to the Deposit Account.

Dated: December 15, 2004

Respectfully submitted,

By   
Emily C. Tongco

Registration No.: 46,473  
MORRISON & FOERSTER LLP  
3811 Valley Centre Drive, Suite 500  
San Diego, California 92130  
(858) 314-5413



## TRADERS' GUIDE TO FERMENTATION MEDIA FORMULATION

D. W. Zabriskie, PhD, BioChem Technology, Inc.  
W. B. Armiger, PhD, BioChem Technology, Inc.  
D. H. Phillips, PhD, BioChem Technology, Inc.  
P. A. Albano, Traders Protein

© 1980, Traders Protein  
Second Printing, 1982

Traders Guide to Fermentation Media  
Formulation was produced by Traders Protein,  
P.O. Box 8407, Memphis, Tennessee 38108  
USA. Reproduction in part or whole requires  
the written permission of Traders Protein.

Traders Protein gratefully acknowledges the  
assistance of BioChem Technology, Inc.,  
Malvern, Pennsylvania USA in the preparation of  
this book. We also appreciate the assistance of  
Dr. W. W. Umbreit, Rutgers University, and  
Dr. B. W. Churchill, The Upjohn Company.

compounds usually closely resemble the form in which they will ultimately be incorporated in the cellular material.

energy source in war

Final pH 7.4 to 7.6.

medium (pH 5 - 5.5) add 6 ml of 1N  $H_2SO_4$  per liter of final medium.

1

(c) Cerelease -- Corn products, a unit of C. ...

The microbial environment is largely determined by the composition of the growth medium. Media are generally formulated for specific purposes. A cultivation medium is designed to support active growth whereas a storage medium is used for its ability to sustain viability under conditions unfavorable for growth. An enrichment medium is used to enhance the growth of a particular species in the presence of other contaminants. Differential media are used in the identification process, and media for determination of physiological properties are generally used to study microbial metabolism (2).

Often a culture medium is prepared using pure compounds in precisely defined proportions.

Media of this type are called synthetic or defined, and examples are shown in Table 1. Alternatively, media can be formulated using ingredients of natural origin which are not completely defined chemically, such as blood, meat extracts, molasses, and cottonseed flour. These are referred to as complex or natural media and some examples are shown in Table. 2.

Defined media are usually preferred for research since they permit one to determine the specific requirements for growth and product formation by systematically adding or eliminating chemical species from the formulation. Other advantages of a defined medium include its reproducibility, low foaming

2



# 1. Fermentation Media Formulation

## 1.1. Introduction

It is generally accepted that fermentation media development is a mixture of art and science. The scientific basis rests with those fundamental biochemical aspects of microorganisms which are general to large groups of species. The art is required when the specific biochemical details of the species of interest are unknown. Success or failure then rests on the microbiologist's experience and judgement to experimentally determine the environmental conditions which best allow the microorganism to express the biological characteristics of commercial importance.

Two nutritional factors essential to microbial activity are 1) a source of energy for cell metabolic processes, and 2) a source of materials from which cellular matter and products can be synthesized. Microorganisms can obtain energy from their environment in a variety of ways. Some algae, photosynthetic bacteria, and protozoa utilize solar radiation for this purpose and are termed phototrophs. Most microorganisms, however, use the energy stored in the chemical bonds of various compounds and are called chemotrophs. Chemotrophs can be subdivided into lithotrophs and organotrophs depending on their ability to utilize inorganic and organic material as an energy source. The means by which carbon is assimilated provides another basis for classifying microorganisms. Autotrophs only require carbon as  $\text{CO}_2$  while heterotrophs require carbon in more complicated molecular forms (1). The microorganisms of greatest commercial importance are the heterotrophs (1).

The second nutritional factor is the requirement for sources of all the elements (C, H, O, N, P, S, K, etc.) that will be combined in various ways to form cellular material or products. Some microorganisms can utilize elements in the form of simple compounds while more fastidious species require their nutrients as more complex compounds usually closely related to the form in which they will ultimately be incorporated in the

Table 1  
Defined Media Used in Laboratory Studies

<u>Davis Medium (3)</u>	
Suitable for enteric fermentative microorganisms	
Energy Source	2 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	7 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/l
Na-Citrate $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g/l

<u>"B" Medium (4)</u>	
Low in phosphates-suitable for oxidative microorganisms	
Energy Source	1-10 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g/l
NaCl	0.2 g/l
Iron	Trace
Trace Elements Concentrate	1-10 ml/l

Trace Elements Concentrate	
EDTA	5 g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22 g/l
$\text{CaCl}_2$	0.55 g/l
$\text{MnCl}_2$	0.5 g/l
$\text{FeSO}_4$	0.5 g/l
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1 g/l
$\text{CuSO}_4$	0.16 g/l
$\text{CoCl}_2$	0.16 g/l

<u>Vogel and Bonner Medium (5)</u>	
Nutrient Concentrate-self sterilizing. Dissolve the components below in 670 ml of water in order listed:	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10g
Citric Acid $\cdot \text{H}_2\text{O}$	100g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{anhydrous}$	500g
$\text{Na}(\text{NH}_4)\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	175g

Final medium made by aseptically adding 1 ml of concentrate to 49 ml of a sterilized solution of the energy source in water.

Final pH 7.4 to 7.6. For acid medium (pH 5 - 5.5) add

tendency, translucency, and the relative ease of product recovery and purification. However, in many cases low product yield and poor economy make complex or natural media the preferred choice in industrial fermentations (9).

The process of fermentation media formulation usually begins by developing a carefully defined formulation to determine the specific requirements. This phase is followed by a transition to a natural media in order to scale-up the formulation to a commercially viable process. In the discussion to follow, it is assumed that the growth and product formation requirements have been determined in the laboratory on a defined medium, and it is now desired to formulate a media based upon natural ingredients.

## 1.2. Components of Industrial Fermentation Media

Fermentation nutrients can be classified as sources of carbon, nitrogen, inorganic components, and vitamins according to their principal function in the medium. Carbohydrates are referred to as carbon sources, although they also supply combined oxygen and hydrogen. Proteins and amino acids are important nitrogen sources, although they also are sources of carbon, oxygen, hydrogen, and sulfur. The objective in formulating the medium is to blend ingredients rich in some nutrients and deficient in others with materials possessing other composition profiles to achieve the proper balance.

### 1.2.1. Carbon Sources

#### 1.2.1.1. Carbohydrates

Carbohydrates are excellent sources of carbon, oxygen, hydrogen, and metabolic energy for many microorganisms. They are available as simple sugars or as sugar polymers such as starch, dextrans, cellulose, and hemicellulose. Since biomass is typically 50% carbon on a dry

weight basis, carbohydrates frequently are present in the media in concentrations higher than other nutrients and are used in the range of 0.2-20%

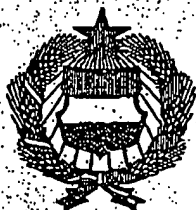
Although all carbohydrates have an empirical formula of  $(CH_2O)_n$ , they are not equally available to microorganisms. In general terms availability may be ranked as hexoses > disaccharides > pentoses > polysaccharides. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* can only grow on some hexoses and disaccharides while the yeast *Candida utilis* will grow on some hexoses, disaccharides, and pentoses. Neither strain will grow on polysaccharides such as starch, hemicellulose, and cellulose. These materials can be made available to the yeast only after the polymers are hydrolyzed to yield simple sugars using acid, base, or enzymatic catalysts. Other microorganisms such as *Bacillus subtilis* and *Trichoderma reesei* secrete extracellular hydrolytic enzymes into their environment. These enzymes are capable of depolymerizing polysaccharides to form simple sugars. Still other microorganisms can grow well on a variety of carbohydrates, yet the yield of product may be strongly dependent on the source. Table 3 demonstrates this situation for the production of a  $\beta$ -lactam antibiotic by *Cephalosporium acremonium* in which glucose favors cell growth, galactose maximizes antibiotic concentration, and sucrose optimizes antibiotic yield per cell (10). It is therefore important to determine these nutritional characteristics before selecting a carbohydrate source for the cultivation of a specific species.

Simple sugars are available as powders or syrups, provided in a variety of purities. Glucose and sucrose are used in the greatest volumes by the fermentation industry. Glucose is generally derived from the hydrolysis of corn starch, although starch from other grains and cellulosic materials is sometimes used. Sucrose is most often purchased as molasses. Lactose from cheese whey and xylose from sulfite waste liquor are used in smaller amounts.

Table 3  
 $\beta$ -Lactam Antibiotic Production by *Cephalosporium acremonium* on Different Carbohydrates (10)

Carbon-Source	Antibiotic Concentration $\mu\text{g/ml}$	Cell Concentration $\text{mg/ml}$	Yield of Antibiotic $\mu\text{g/mg of Cells}$
Glucose	830	22.5	36.9
Maltose	1130	21.8	51.9
Fructose	1250	21.5	58.1
Galactose	1650	19.1	86.4
Sucrose	1040	11.9	87.4

(19) HU

MAGYAR  
NÉPKÖZTÁRSASÁGORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATALSZABADALMI  
LEÍRÁS

SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

(11)

(13)

195 540 B

Nemzetközi  
osztályjelzet:  
(51) NSZÖ<sub>4</sub>  
C 12 P 37/02

(21) (5025/85)

(22) A bejelentés napja: 85. 12. 29.

(41) (42) Közzététel napja: 87. 11. 30.

(45) A leírás megjelent: 89. 03. 20.

Feltaláló(k): (72)

Dr. PÓLYA Kálmán, 39%; HÖGYE Irma, 28%; SERES Péter,  
28%; NAGY János, 2,5%; SZTÁRAY Gyuláné, 2,5%; Debre-  
cen, HU

Szabadalmaz: (73)

BIOGAL Gyógyszergyár, Debrecen, HU

(54) ELJÁRÁS G- ÉS V-PENICILLIN ELŐÁLLÍTÁSÁRA FERMENTÁCIÓS ÚTON

## (57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás-G- és V-penicillin előállítására fermentációs úton valamely *Penicillium chrysogenum* törzssel 24–25 °C-on, 0,7–1,3 lf. levegő/tf. fermentléc/perc levegőztetés mellett, miközben G-penicillin előállításánál a fenilecetsav, V-penicillin előállításánál a fenoxiecetsav koncentrációját legalább 0,05 t.%, a pH-t ammónium-szulfát, ammónium-hidroxid és kálium-hidroxid oldatok adagolásával 6,2–7,0, az oldott nitrogéntartalmat legalább 20 mg/100 ml, a nedves sejtörmegtartalmat napraforgóolaj, szacharóz oldat, és víz adagolásával legfeljebb 53 tf.% értéken tartják, oly módon, hogy a rendszerből 90 órás fermentáció után a fermentlé 5–10 tf.-%-át 10–20 órás időközökben leengedik és a folyamatot 160–240 órán át folytatják.

1

195 540

2

A találmány tárgya eljárás G- és V-penicillin előállítására *Penicillium chrysogenum* törzsek félfolyamatos, süllyesztett kultúrák tenyésztésével.

Ismeretes, hogy a penicillin süllyesztett kultúra előállítása volt az első ipari antibiotikum gyártó biotechnológiai folyamat, melynek biokémiai folyamatszabályozását megoldották. E folyamatszabályozás lényege az, hogy a tápanyagok oldatát olyan ütemben adagolják a tenyészetbe, hogy azzal az anyagcsere-folyamatok intenzitását a termelés szempontjából optimális értéken tartásuk.

A 180 399 számú magyar szabadalmi leírás az anyagcserezabályozott korszerű penicillin fermentációs folyamat tipikus példáját mutatja be.

E folyamatok gazdasági előnyei a nem anyagcserezabályozott folyamatokhoz viszonyítottnak a következőkből adódnak:

- A hozamot döntő módon befolyásoló repressziós, és limitációs jelenségek elmaradnak.
- A táptalaj a süllyesztett tenyésztés indításakor (beoltásakor) relatíve hig, kevés tápanyagot tartalmaz, ezért a tenyészet megfelelő oxigénátvitelt biztosító kevertetéséhez relatíve kevés energia (2-3 kW/m<sup>3</sup>) szükséges.
- A tápanyagok adagolásával nemcsak az anyagcsere intenzitása, hanem a fermentáló mikroorganizmus szaporodása is befolyásolható; elkerülhető a túlzott viszkozitáshoz az oxigénátvitel leromlásához vezető túlszaporodás; biztosítható a legjobb oxigénátvitelt lehetővé tevő optimális pellet-méret.

E folyamatoknak azonban a nem anyagcserezabályozott folyamatokhoz viszonyítottnak van egy jelentős gazdasági hátránya; a relatíve rossz fermentor-kapacitáskihasználás, ami abból adódik, hogy a tápanyagok oldatát adagolni kell. Ahhoz, hogy az adagolt oldatok beleférjenek a fermentorba, indulásnál a fermentálé térfogata csak jóval kevesebb lehet, mint amennyit a fermentor hasznos kapacitása befogadni képes lenne; mintegy 65-70%-a annak. Így a bioszintézist végző mikroorganizmus-tömeg is kevesebb, és csak a fermentáció végén éri el a maximumot, amikor a fermentálé térfogata a fermentor hasznos kapacitáसाig emelkedik.

Eljárásunk alapját az a felismerés képezi, hogy amennyiben a fermentálé térfogatát a fermentor hasznos kapacitásának 90-95%-áról indítjuk, majd a tápanyag-oldatok adagolása következtében amikor a hasznos térfogat 100%-át elérjük, a fermentálé 5-10 tf.-%-át feldolgozásra leengedjük, majd az adagolást tovább folytatva a folyamatot többször megismételjük, végül is egy folyamatos fermentációhoz hasonló, közel állandó állapotot érhetünk el.

Eljárásunk nemcsak arra alkalmas, hogy az anyagcserezabályozott fermentációk tulajdonképpen egyetlen, de nagyon lényeges hibáját kiküszöbölje, hanem arra is, hogy további, a hozamot előnyösen befolyásoló lehetőséggel szolgáljon. Ezzel az eljárással a fermentálévek hatóanyag-tartalmát is a táptalaj-kihasználás, a végtermékgátás és a feldolgozás együttesen mérlegelt optimum-értékén lehet tartani.

Eljárásunk lényegesebb előnyeit (a fermentor kapacitás jobb kihasználása, időegység alatt több termék előállítása) az alábbi táblázatban feltüntetett adatokkal szemléltetjük.

Hatóanyagtermelési sebességek összehasonlító táblázata

	Fermentációs időköz, (óra)	1. példa E/ml/óra	2. példa E/ml/óra	3. példa E/ml/óra	4. példa E/ml/óra	5. példa E/ml/óra
5	0-40	176	195	210	225	219
	0-60	225	242	237	304	296
10	0-80	218	245	243	264	291
	0-100	212	227	275	281	300
	0-120	208	218	280	275	285
	0-140			280	278	283
15	0-160			279	272	270
	0-180			260	267	270
	0-200			245	259	265

A fenti összegzett előnyökből adódóan eljárásunkkal 20 1 m<sup>3</sup> fermentorkapacitás felhasználásával egy hónap alatt (720 munkaóra) 81,7, illetve 91,3 kg nyers G-, illetve V-penicillin-káliumsó bioszintetizálható, szemben az azonos törzssel és azonos rendszerben hagyományos módon anyagcserezabályozott (fed batch) technológiával, 25 magasabb fajlagos anyagfelhasználás mellett elérhető 68,2 illetve 76,0 kg értékekkel.

A fenti táblázatban az 1. és 2. példának megfelelő adatok, valamint a leírás 1. és 2. kiviteli példái a 189 287 számú magyar szabadalmi leírásban foglalt szakaszos fermentációs eljárásnak felelnek meg, illetve a nevezett eljárás reprodukciós példái.

Eljárásunk kivitelezését a 3., 4. és 5. példával szemléltetjük.

#### 1. példa

A BIOGAL Gyógyszergyár tulajdonában lévő ipari termelésre alkalmazott URG M. jelzésű *Penicillium chrysogenum* törzsből (deponálási szám 1 MNG-00237) 80 liter előfermentációt készítettünk. Az előfermentációt 630 liter alaptáptalajba oltottuk, melynek összetétele a következő volt:

(földi) mogyoróliszt	2,5 tf. %
kukoricalekvár	
(100 % szárazanyag-tartalom)	1,0 tf. %
nátriumtioszulfát	0,06 tf. %
kalciumkarbonát	0,78 tf. %
napraforgóolaj	0,28 tf. %

A fermentációs paraméterek a következők voltak:

felhasznált energia 800 liter	
fermentálé térfogatnál mérve	2,6 kW/m <sup>3</sup>
hőmérséklet	25 °C
belső nyomás	10 <sup>5</sup> Pa
levegőztetés	1 Nm <sup>3</sup> /1m <sup>3</sup>
	f.lé/perc

60 A fermentációt 120 órán át futtattuk. Ezalatt összesen 10,9 tömeg % szénforrást adagoltunk a tenyészetbe, a szénforrás 8 t.-% a napraforgóolaj, 92 t.-% a szaharóz volt.

A fermentáció 10 óráskorában 0,06 t.-% fenilecetsav 65 oldatot adagoltunk a fermentálébe, majd a fermentáció

1

195 540

2

teljes lefutása alatt folyamatos adagolással a fenilecetsav koncentrációját 0,05–0,08 t.% értékek között tartottuk. A pH szabályzására ammóniumsulfát, ammóniumhidroxid és káliumhidroxid oldatokat alkalmaztunk, úgy adagolva a fenti anyagokat, hogy a pH 6,2–6,9; az oldott nitrogéntartalom 0–105 órák során 75–20 mg/100 ml értékek között maradjon. Az oldott nitrogéntartalom meghatározására RADELKIS OP-264/1 ammónia és pH mérőt alkalmaztunk. A fenilecetsav meghatározása Hewlett Packard 1084 B magasnyomású folyadék-kromatográffal történt. [Chromatographia Vol. 12. No. 6, June 1979 (380–385).]

A fentiekben jellemzett eljárás kivitelezésére alkalmazott fermentor teljes kapacitása 1150 liter, hasznos kapacitása 850 liter volt.

Eljárásunkkal a fentiek szerint nyert adatok alapján számítva:

1 m<sup>3</sup> teljes fermentortérfogatban

1 hónap alatt

68,2 kg G-penicillin-K-só volt bioszintetizálható.

A penicillintartalom meghatározása Hewlett Packard 1084 B magasnyomású folyadékkromatográffal történt.

A kinyert termék hatóanyagtartalma: 98,8 % (HPLC).  
Op.: 212–215 °C (bomlik).

1 kg penicillin bioszintetizálásához

7,99 kg szacharózt,

0,95 kg ammóniumsulfátot,

0,47 kg fenilecetsavat,

0,73 kg kukoricalekvárt (100 %),

1,83 kg (földi)ogyorólisztet  
használtunk fel.

## 2. példa

A BIOGAL Gyógyszergyár tulajdonában lévő ipari termelésre alkalmazott URC M jelzésű Penicillium chrysogenum törzsből (deponálási szám: MNG-00 237) 80 liter előfermentációt készítettünk. Az előfermentációt 630 liter alaptáptalajba oltottuk, melynek összetétele a következő volt:

(földi)ogyoróliszt	2,5 t.%
kukoricalekvár	
(100 % szárazanyagtartalomra)	1,0 t.%
nátriumtiosulfát	0,06 t.%
kalciumkarbonát	0,78 t.%
fenoxiecetsav	0,56 t.%

A fermentációs paraméterek a következők voltak:

felhasznált energia 800 liter	
fermentálé térfogatnál mérve	2,6 kW/m <sup>3</sup>
hőmérséklet	25 °C
belső nyomás	10 <sup>5</sup> Pa
levegőztetés	1 Nm <sup>3</sup> /1 m <sup>3</sup> f.lé/perc

A fermentációt 120 órán át futtattuk. Ezalatt összesen 10,5 tömeg% szénforrást adagoltunk a tenyésztettséghez, a szénforrás 7 t.%-a napraforgóolaj, 93 t.%-a szacharóz volt.

A fermentáció 56 órák korától a fermentáció teljes lefutása alatt folyamatosan fenoxiecetsav oldatot adagoltunk. Az adagolást olyan ütemben végeztük, hogy a fenoxiecetsav koncentrációja 0,20–0,05 t.% értékek között maradjon. A pH szabályzására ammóniumsulfát,

ammóniumhidroxid és káliumhidroxid oldatokat alkalmaztunk, úgy adagolva a fenti anyagokat, hogy a pH 6,2–6,9, az oldott nitrogéntartalom 0–105 órák során 75–20 mg/100 ml értékek között maradjon.

5 A fentiekben jellemzett eljárás kivitelezésére alkalmazott fermentor teljes kapacitása 1150 liter, hasznos kapacitása 850 liter volt.

Eljárásunkkal a fentiek szerint nyert adatok alapján számítva:

10 1 m<sup>3</sup> teljes fermentortérfogatban

1 hónap alatt

76,0 kg V-penicillin-K-só volt bioszintetizálható.

A kinyert termék hatóanyagtartalma (HPLC): 99,1 %.

15  $[\alpha]_D^{25} = +220^\circ$  (c = 0,2 vízben).

1 kg penicillin bioszintetizálásához:

6,90 kg szacharózt,

0,82 kg ammóniumsulfátot,

0,63 kg fenoxiecetsavat,

20 0,65 kg kukoricalekvárt (100 %),

1,64 kg (földi)ogyorólisztet

használtunk fel.

## 3. példa

A BIOGAL Gyógyszergyár tulajdonában lévő ipari termelésre alkalmazott URC M jelzésű Penicillium chrysogenum törzsből (deponálási szám: MNG-00237) 80 liter előfermentációt készítettünk. Az előfermentációt 720 liter alaptáptalajba oltottuk, melynek összetétele a következő volt:

(földi)ogyoróliszt	1,0 t.%
kukoricalekvár	
(100 % szárazanyagtartalomra)	2,5 t.%
nátriumtiosulfát	0,175 t.%
kalciumkarbonát	0,68 t.%
napraforgóolaj	0,25 t.%

40 A fermentációs paraméterek a következők voltak:

felhasznált energia 800 liter	
fermentálé térfogatnál mérve	2,6 kW/m <sup>3</sup>
hőmérséklet	25 °C
belső nyomás	10 <sup>5</sup> Pa
45 levegőztetés	1 Nm <sup>3</sup> /1 m <sup>3</sup> f.lé/perc

A fermentáció 10 órák korábban 0,06 t.% fenilecetsav oldatot adagoltunk a fermentáléhoz, majd a fermentáció teljes lefutása alatt folyamatos adagolással a fenilecetsavkoncentrációt 0,05–0,08 t.% értékek között tartottuk. A pH szabályzására ammóniumsulfát, ammóniumhidroxid és káliumhidroxid oldatokat alkalmaztunk, úgy adagolva a fenti anyagokat, hogy a pH 6,2–7,0 értéken legyen, ugyanakkor az oldott nitrogéntartalom minimum 20 mg/100 ml értéket érjen el. Szénforrásként a tenyésztettséghez 50 t.%-os szacharóz oldatot és napraforgóolajat adagoltunk. A napraforgóolaj adagolása olyan ütemben történt, hogy a tenyésztettség térfogata a levegőztetés nélküli térfogatot mintegy 15–25 %-kal haladja meg. A szacharóz és napraforgóolaj együttes adagolási ütemét úgy választottuk meg, hogy a fermentáció alatt a nedves sejttérfogat (PCV) érték 38–44 t.% között legyen.

65 A nedves sejttérfogat mérésére JANETZKY T-32 típusú centrifugát alkalmaztunk (g:500).

1

195 540

2

A rendszerhez steril vizet is adagoltunk olyan ütemben, hogy a fermentlé aktivitása ne haladjon meg a feldolgozás szempontjából már nem előnyös 25 000 E/ml értéket.

Amikor a fermentlé térfogata elérte a 850 litert, a rendszerből 50 liter fermentlevet leeresztettünk. Ezt a folyamatot a fermentáció oltásától kezdődően 200 órán keresztül folytattuk.

A fentiekben jellemzett eljárás kivitelezésére alkalmazott fermentor teljes kapacitása 1150 liter, hasznos kapacitása 850 liter volt.

Eljárásunkkal a fentiek szerint nyert adatok alapján számítva:

- 1 m<sup>3</sup> teljes fermentortérfogatban
- 1 hónap alatt
- 81,7 kg G-penicillin-K-só volt bioszintetizálható.

A kinyert termék hatóanyagtartalma (HPLC): 99,2%.  
Op.: 214–216 °C (bomlik).

1 kg penicillin bioszintetizálásához  
5,43 kg szacharózt,  
0,35 kg ammóniumsulfátot,  
0,51 kg fenilecetsavat,  
1,02 kg kukoricalekvárt (100%),  
0,42 kg (földi)ogyorólisztet  
használtunk fel.

#### 4. példa

A BIOGAL Gyógyszergyár tulajdonában lévő ipari termelésre alkalmazott URC M jelzésű *Penicillium chrysogenum* törzsből (deponálási szám: MNG-00237) 80 liter előfermentációt készítettünk. Az előfermentációt 720 liter alaptáptalajba oltottuk, melynek összetétele a következő volt:

(földi)ogyoróliszt	1,0 t. %
kukoricalekvár	
(100% szárazanyagtartalomra)	2,5 t. %
nátriumtiosulfát	0,175 t. %
kalciumkarbonát	0,68 t. %
napraforgóolaj	0,25 t. %
fenoxiecetsav	0,56 t. %

A fermentációs paraméterek a következők voltak:

felhasznált energia	800 liter
fermentlé térfogatnál mérve	
hőmérséklet	25 °C
belső nyomás	10 <sup>5</sup> Pa
levegőztetés	1 Nm <sup>3</sup> /1 m <sup>3</sup> f.lé/perc

A fermentáció 60 óráig korlátolt a fermentáció teljes lefutása alatt folyamatosan fenoxiecetsav oldatot adagoltunk. Az adagolást olyan ütemben végeztük, hogy a fenoxiecetsav koncentrációja 0,20–0,05 t. % értékek között maradjon. A pH szabályozására ammóniumsulfát, ammóniumhidroxid és káliumhidroxid oldatokat alkalmaztunk, úgy adagolva a fenti anyagokat, hogy a pH 6,2–7,2 értékek között legyen, ugyanakkor az oldott nitrogéntartalom minimum 20 mg/100 ml értéket érjen el. Szénforrásként a tenyészethez 50 t. %-os szacharózoldatot és napraforgóolajat adagoltunk. A napraforgóolaj adagolása olyan ütemben történt, hogy a tenyészet térfogata a levegőztetés nélküli térfogatot mintegy 15–25 %-kal

haladja meg. A szacharóz és napraforgóolaj együttes adagolási ütemét úgy választottuk meg, hogy a fermentáció alatt a nedves sejtterfogat (PCV) érték 38–44 t. % között legyen.

5 A rendszerhez steril vizet is adagoltunk olyan ütemben, hogy a fermentlé aktivitása ne haladjon meg a feldolgozás szempontjából már nem előnyös 25 000 E/ml értéket.

10 Amikor a fermentlé térfogata elérte a 850 litert, a rendszerből 50 liter fermentlevet leeresztettünk. Ezt a folyamatot a fermentáció oltásától kezdődően 200 órán keresztül folytattuk.

A fentiekben jellemzett eljárás kivitelezésére alkalmazott fermentor teljes kapacitása 1150 liter; hasznos kapacitása 850 liter volt.

Eljárásunkkal a fentiek szerint nyert adatok alapján számítva:

- 1 m<sup>3</sup> teljes fermentortérfogatban
- 1 hónap alatt
- 89,2 kg V-penicillin-K-só volt bioszintetizálható.

A kinyert termék hatóanyagtartalma (HPLC): 99,0%.  
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = 219° (c = 0,2 vízben).

1 kg penicillin bioszintetizálásához  
5,25 kg szacharózt,  
0,38 kg ammóniumsulfátot,  
0,70 kg fenoxiecetsavat,  
0,94 kg kukoricalekvárt (100%),  
0,38 kg (földi)ogyorólisztet  
30 használtunk fel.

#### 5. példa

A BIOGAL Gyógyszergyár tulajdonában lévő ipari termelésre alkalmazott URC M jelzésű *Penicillium chrysogenum* törzsből (deponálási szám: MNG-00237) 80 liter előfermentációt készítettünk. Az előfermentációt 720 liter alaptáptalajba oltottuk, melynek összetétele a következő volt:

(földi)ogyoróliszt	1,0 t. %
kukoricalekvár	
(100% szárazanyagtartalomra)	2,5 t. %
nátriumtiosulfát	1,175 t. %
kalciumkarbonát	0,68 t. %
napraforgóolaj	0,25 t. %
fenoxiecetsav	0,56 t. %

A fermentációs paraméterek a következők voltak:

felhasznált energia	800 liter
fermentlé térfogatnál mérve	
hőmérséklet	25 °C
belső nyomás	10 <sup>5</sup> Pa
levegőztetés	1 Nm <sup>3</sup> /1 m <sup>3</sup> f.lé/perc

55 A fermentáció 60 óráig korlátolt a fermentáció teljes lefutása alatt folyamatosan fenoxiecetsav oldatot adagoltunk. Az adagolást olyan ütemben végeztük, hogy a fenoxiecetsav koncentrációja 0,20–0,05 t. % értékek között maradjon. A pH szabályozására ammóniumsulfát és ammóniumhidroxid oldatokat alkalmaztunk, úgy adagolva a fenti anyagokat, hogy a pH 6,2–7,0 értékek között legyen, ugyanakkor az oldott nitrogéntartalom minimum 20 mg/100 ml értéket érjen el. Szénforrásként a tenyészethez 50 t. %-os szacharózoldatot és napraforgóolajat

1

195 540

2

adagoltunk. A napraforgóolaj adagolása olyan ütemben történt, hogy a tenyészet térfogata a levegőztetés nélküli térfogatot mintegy 15–25%-kal haladja meg. A szacharóz és napraforgóolaj együttes adagolási ütemét úgy választottuk meg, hogy a fermentáció alatt a nedves sejttérfogat (PCV) érték 44–54 t.% között legyen.

A rendszerhez steril vizet is adagoltunk olyan ütemben, hogy a fermentlé aktivitása ne haladja meg a feldolgozás szempontjából már nem előnyös 25 000 E/ml értéket.

Amikor a fermentlé térfogata elérte a 850 litert, a rendszerből 50 liter fermentlevet leeresztettünk. Ezt a műveletet a fermentáció oltásától kezdődően 200 órán keresztül folytattuk.

A fentiekben jellemzett eljárás kivitelezésére alkalmazott fermentor teljes kapacitása 1150 liter, hasznos kapacitása 850 liter volt.

Eljárásunkkal a fentiek szerint nyert adatok alapján számítva:

1 m<sup>3</sup> teljes fermentortérfogatban

1 hónap alatt

91,3 kg V-penicillin-K-só volt bioszintetizálható.

A kinyert termék hatóanyagtartalma (HPLC): 99,1 %.

$[\alpha]_D^{25} = 220^\circ$  (c = 0,2 vízben).

1 kg penicillin bioszintetizálásához

5,48 kg szacharózt,

0,41 kg ammóniumszulfátot,

0,67 kg fenoxieccetsavat,

0,92 kg kukoricaekvart (100%),

5 0,37 kg (földi) mogorólisztet

használtunk fel.

## SZABADALMI IGÉNYPONT

- 10 Eljárás G- és V-penicillin előállítására fermentációs úton valamely *Penicillium chrysogenum* fajhoz tartozó törzssel, előnyösen *Penicillium chrysogenum* URC M (deponálási szám: MNG-00237) jelzésű törzssel 24–25 °C-on, 0,7–1,3 tf. levegő/tf. fermentlé/perc levegőztetés mellett, miközben G-penicillin előállításánál a fenileccetsav, V-penicillin előállításánál a fenoxieccetsav koncentrációját legalább 0,05 t.%, a pH-t ammónium-szulfát, ammónium-hidroxid és kálium-hidroxid oldatok adagolásával 6,2–7,0, az oldott nitrogén tartalmat legalább 20 mg/100 ml, a nedves sejttömeg tartalmat napraforgóolaj, szacharóz oldat és víz adagolásával legfeljebb 53 t.% értéken tartjuk, azzal jellemezve, hogy a rendszerből 90 órás fermentáció után a fermentlé 5–10 t.%-át 10–20 órás időközökben leengedjük és a folyamatot 160–240 órán át folytatjuk.
- 15
- 20
- 25

Ábra nélkül



# SBG&K PATENT AND LAW OFFICES

PARTNERSHIP OF LAWYERS AND PATENT ATTORNEYS BUDAPEST

Budapest, May 15, 2003

Your ref.: 02818US/DIV1/VS

Our ref.: GEN/82/03/SZE/Sző

VIA TELEFAX  
31 15 2793957  
Total pages: 4

Messrs.  
DSM N.V.  
Patents and Trademarks  
Attn.: Dr. V.R. Swarte  
Delft

DOSS 02818US/DIV 1/				
15 MEI 2003				
2003/05/3029				
VS				
TO	CS	TAX	CIRC	

## ATTORNEYS AT LAW:

Dr. Katalin JZAMOSI  
President of the Board  
Managing Partner  
Dr. Róbert BÉRCZES  
Member of the Board  
Dr. Gabriella SASVÁRI  
Member of the Board

Dr. Éva SZALONTAY  
Dr. Katalin ÁRVA  
Dr. István BAJKAI  
Dr. László BÉRCZES  
Dr. Gábor GERMUS  
Dr. Miklós KRZYŻEWSKY

## OF COUNSEL:

Dr. Ádám SZENTPÉTERI  
Dr. Vilmos BACHER

## PATENT ATTORNEYS:

Ádám SZENTPÉTERI  
Member of the Board  
Managing Partner  
László BÉLCZAY  
Member of the Board

Dr. Tamás BOKOR  
Emília CSANAK  
Dr. Bernadett LALAI  
Katalin DERZSI  
Katalin DÖNUSZ  
Dr. Judit JAKAB  
Dr. Zoltán KÖTELES  
Zsuzsanna LÁNG  
András MÁK  
Dr. Éva PARRAGH  
Zoltán RÁTHONYI  
Mária SOMLAI  
Dr. Emília SÓVÁRY  
Zsolt SZENTPÉTERI

Re.: US Patent Application No. 09/982,474 (Hungarian Patent No. 195540)  
in the name of DSM N.V.

Dear Sirs,

This is to revert to your fax message of 13, May 2003.

Please find below the components of the fermentation media as mentioned in the examples:

### Example 1:

Peanut flour  
Corn steep liquor (100% dry material content)  
Sodium thiosulphate  
calcium carbonate  
sunflower oil

### Example 2:

Peanut flour  
Corn steep liquor (100% dry material content)  
Sodium thiosulphate  
calcium carbonate  
phenoxyacetic acid





- 3 -

Please be advised that Example 1, most probably by mistake, lists phenylacetic acid instead of the phenoxyacetic.

Should you wish to obtain additional information, please do not hesitate to contact us.

Very truly yours,

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Adam Szentpeteri, Jr.'.

Ádám Szentpéteri, Jr.  
Managing Partner

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**